

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
21. Juni 2001 (21.06.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/44501 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/68, G01N 27/26 (74) Anwalt: GASSNER, Wolfgang; Nägelsbachstr. 49A, 91052 Erlangen (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/04438 (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (22) Internationales Anmeldedatum: 13. Dezember 2000 (13.12.2000) —
- (25) Einreichungssprache: Deutsch (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 199 60 076.7 13. Dezember 1999 (13.12.1999) DE
- (71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): NOVEMBER AKTIENGESELLSCHAFT GESELLSCHAFT FÜR MOLEKULARE MEDIZIN [DE/DE]; Ulrich-Schalk-Strasse 3a, 91056 Erlangen (DE).
- Veröffentlicht: — Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): SCHÜLEIN, Jürgen [DE/DE]; Neue Strasse 26, 91054 Erlangen (DE). HASS-MANN, Jörg [DE/DE]; Hofmannstrasse 118 a, 91052 Erlangen (DE).
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR DETECTING AND QUANTIFYING BIOMOLECULES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUM NACHWEIS UND ZUR QUANTIFIZIERUNG VON BIOMOLEKÜLEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for detecting and quantifying a first biomolecule in a solution (5, 8), comprising the following steps: a) binding of the first biomolecule (5, 8) to a second biomolecule (3, 7) which at least along segments thereof exhibits a specific affinity to a first biomolecule and b) determination of the electrical conductivity of a complex formed from the first (3, 7) and the second biomolecule (5, 8), whereby the second biomolecule (3, 7) forms a bridge between a first 2a and a second electrode 2b.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis und zur Quantifizierung eines in einer Lösung enthaltenen ersten Biomoleküls (5, 8) mit folgenden Schritten: a) Binden des ersten Biomoleküls (5, 8) an ein zweites Biomolekül (3, 7), welches zum ersten Biomolekül zumindest abschnittsweise eine spezifische Affinität aufweist und b) Messen der elektrischen Leitfähigkeit des aus dem ersten (3, 7) und dem zweiten Biomolekül (5, 8) gebildeten Komplexes, wobei das zweite Biomolekül (3, 7) eine Brücke zwischen einer ersten 2a und einer zweiten Elektrode 2b bildet.

WO 01/44501 A2

Verfahren und Vorrichtung zum Nachweis und zur Quantifizierung von Biomolekülen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zum
5 Nachweis und zur Quantifizierung eines in einer Lösung enthaltenen ersten Biomoleküls.

Nach dem Stand der Technik ist es bekannt, Polynukleotidsequenzen, wie DNA, durch voltammetrische Verfahren nachzuweisen.
10 Dazu wird in der US 5,312,572 vorgeschlagen, redoxaktive Moleküle der die DNA enthaltenden Lösung zuzusetzen. Die redoxaktiven Moleküle binden im Falle der Hybridisierung der DNA an das gebildete doppelsträngige DNA-Molekül. Das redoxaktive Molekül bewirkt ein meßbares Redoxsignal.

15 Ein ähnliches Verfahren ist aus der US 5,871,918 bekannt. Aus der US 5,874,046 ist ein Sensorsystem bekannt, bei dem an einer Elektrode eine dotierte Oligonukleotidsequenz gebunden ist. Es wird die im Falle der Hybridisierung der Oligonukleotidsequenz auftretende erhöhte Leitfähigkeit z.B. mittels zyklischer Voltammetrie indirekt gemessen. Das Bereitstellen dotierter Oligonukleotide ist aufwendig. Die indirekte Messung der Leitfähigkeit mittels zyklischer Voltammetrie weist eine geringe Sensitivität auf.
20

25 Aus der WO 96/01836 ist ein sogenannter Chip zum Nachweis von Polynukleotidsequenzen bekannt. Der Chip ist aus einem z.B. Silizium hergestellten Substrat gebildet. Auf dem Chip sind eine Vielzahl miniaturisierter Reaktionsfelder vorgesehen. In
30 jedem der Reaktionsfelder ist eine besondere Polynukleotidsequenz gebunden. Beim Eintauchen des Chips in eine die nachzuweisende Polynukleotidsequenz enthaltende Lösung kommt es zur Hybridisierung mit einer der besonderen Polynukleotidsequenzen.

zen. Die Hybridisierung wird mittels Fluoreszenz nachgewiesen.

5 Auch die WO 95/12808 betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Polynukleotidsequenzen mittels Chip. Dabei wird über den Chip nach Art einer Elektrode eine Spannung angelegt. Geladene in der Lösung befindliche Polynukleotidsequenzen werden dadurch an der Oberfläche des Chips bzw. den dort vorgesehenen miniaturisierten Reaktionsfeldern angereichert.

10

Aus der US 5,591,578 ist eine voltammetrische Detektionsmethode zur Identifikation von einzelsträngigen Target-Nukleinsäuresequenzen bekannt. Dabei wird eine zur Target-Nukleinsäuresequenz komplementäre Nukleinsäuresequenz kovalent an die Elektrode gebunden. An dieser Nukleinsäuresequenz sind kovalent redoxaktive Übergangsmetallkomplexe gebunden. Im Falle der Hybridisierung ist ein erhöhtes Redoxsignal meßbar.

20 Die US 5,783,063 offenbart ein Verfahren zur Abschätzung von Parametern zur Charakterisierung von Nukleinsäure-Proben.

Die DE 198 08 884 beschreibt ein Verfahren zum Nachweis von chemischen Substanzen unter Verwendung von zwei in Wechselwirkung stehenden fluorophoren Gruppen, welche an ein Molekül gebunden sind. Bei spezifischer Anlagerung wird eine Wechselwirkung zwischen den fluorophoren Gruppen geändert.

30 In der DE 198 11 732 ist eine Mikrotiterplatte beschrieben. Diese ist mit kovalent gebundenen Oligonukleotiden beschichtet. Die Mikrotiterplatte kann zum Nachweis mittels PCR hergestellter Produkte verwendet werden.

Die WO 99/47700 bezieht sich auf ein Verfahren zum Nachweis von einer Nukleotidsequenz mittels Fluoreszenz. Dabei wird ein Molekül mit einer fluorophoren Gruppe an einer festen Phase gebunden. Bei Vorliegen der Targetsequenz wird eine
5 zweite fluorophore Gruppe derart angebunden, daß ein strahlungsloser oder direkter Energieübertrag zwischen den fluorophoren Gruppen stattfinden kann.

Aus der WO 99/47701 ist ein Verfahren zum Nachweis einer Nukleotidsequenz mittels PCR bekannt. Bei der Durchführung der
10 PCR werden drei Primer verwendet, wobei der dritte Primer an einer festen Phase gebunden ist. Er dient der Anreicherung des Reaktionsprodukts und der Verkürzung der Reaktionszeit.

15 Aus Kelly, S.O., Ang. Chem. Int. Ed 38 (7), 941 (1999), "Long-Range Elektron Transfer through DNA Films" ist es bekannt, daß in doppelsträngiger DNA ein Elektronentransfer mit einer langen Reichweite stattfinden kann.

20 Die nach dem Stand der Technik bekannten Verfahren zum Nachweis von DNA sind aufwendig. Sie erfordern z.B. den Zusatz redoxaktiver Moleküle. Eine exakte Quantifizierung der nachzuweisenden DNA bzw. Biomoleküle ist mit den bekannten Verfahren nicht möglich. Die zum Nachweis eingesetzte optische
25 Detektion erfordert ferner einen hohen apparativen Aufwand.

Aufgabe der Erfindung ist es, die Nachteile nach dem Stand der Technik zu beseitigen. Es sollen insbesondere ein möglichst sensitives Verfahren sowie eine Vorrichtung für den
30 gleichzeitigen Nachweis und die Quantifizierung geringer Mengen von in einer Lösung befindlichen Biomolekülen angegeben werden.

Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1 und 21 gelöst. Zweckmäßige Ausgestaltungen ergeben sich aus den Merkmalen der Ansprüche 2 bis 20 und 22 bis 36.

5 Nach Maßgabe der Erfindung ist ein Verfahren zum Nachweis und/oder zur Quantifizierung eines in einer Lösung enthaltenen ersten Biomoleküls vorgesehen, mit folgenden Schritten:

10 a) Binden des ersten Biomoleküls an ein zweites Biomolekül, welches zum ersten Biomolekül zumindest abschnittsweise eine spezifische Affinität aufweist und

15 b) Messen der elektrischen Leitfähigkeit des aus dem ersten und dem zweiten Biomolekül gebildeten Komplexes, wobei das zweite Biomolekül eine Brücke zwischen einer ersten und einer zweiten Elektrode bildet.

Das vorgeschlagene Verfahren ist besonders sensitiv. Im Falle der Bildung eines z.B. aus erstem und zweitem Biomolekül gebildeten doppelsträngigen Komplexes ist es möglich, durch die 20 zwischen der ersten und zweiten Elektrode gebildete Brücke eine Änderung der elektrischen Eigenschaften zu erfassen. Es sind also einzelne Biomoleküle in der Lösung detektierbar. Das ermöglicht auch die Quantifizierung kleinster Mengen.

25 Unter dem Begriff Biomolekül werden Moleküle verstanden, welche zumindest abschnittsweise eine spezifische Affinität zueinander aufweisen und bei Bildung einer gegenseitigen Bindung entlang des gebundenen Abschnitts veränderte elektrische 30 Eigenschaften zeigen. Unter einem "Biomolekül" wird insbesondere ein aus Nukleinsäuren gebildetes Molekül verstanden. Ein solches Molekül weist zumindest zwei kovalent gebundene Nukleotide auf. Die Nukleinsäure enthält üblicherweise Phospho-

- diester-Bindungen. Sie kann aber auch zum Beispiel Phosphoramid-, Phosphorthionat-, Phosphordithionat-, O-Methylphosphoroamideit-Bindungen oder Petitnukleinsäure-Bindungen aufweisen. Die Nukleinsäuren können einzel- oder doppelsträngig
5 sein. Es kann sich um DNA, RNA oder ein Hybrid handeln, bei dem die Nukleinsäure eine Kombination von Desoxiribo- und Ribonukleinsäuren enthält. Auch Proteine, PNA und dgl. werden unter der Begriff "Biomolekül" verstanden.
- 10 Im Sinne der vorliegenden Erfindung weisen zwei Moleküle dann zueinander eine "spezifische" Affinität auf, wenn sie aufgrund attraktiver Wechselwirkungen, z.B. Wasserstoffbrückenbindungen, van-der-Waals-Kräfte ionischer oder kovalenter
15 Bindung, eine Bindung eingehen können oder zumindest eine Tendenz besitzen, sich über schwache Wechselwirkungen, wie z.B. Wasserstoffbrückenbindungen oder dgl., gegenseitig zu binden. Eine solche spezifische Affinität besitzen z.B. Moleküle wie Antigen/Antikörper, Streptavidin/Biotin, Li-
20 gand/Rezeptor und komplementäre Nukleinsäuresequenzen.
- Unter dem Begriff "Komplex" wird eine Assoziation aus mindestens zwei Biomolekülen verstanden, welche in Folge ihrer Affinität zueinander ein Konstrukt bilden.
- 25 Nach einer Ausgestaltung wird das zweite Biomolekül vor dem Schritt lit. a zumindest mit einem Ende an eine der Elektroden gebunden. Die Bindung des mindestens einen Endes des zweiten Biomoleküls an die eine Elektrode kann über eine direkte Bindung ein Spacer- und/oder ein Linker-Molekül vermit-
30 telt werden. Nach einer weiteren Ausgestaltung wird das zweite Biomolekül vor oder nach dem Schritt lit. a mit dem anderen Ende an die zweite Elektrode gebunden. Im letzteren Fall kann das Binden des anderen Endes durch Anlegen eines Poten-

tials unterstützt werden. An das freie Ende des zweiten Biomoleküls kann ein im geeigneten Potentialbereich geladenes Molekül, im folgenden Ladungsträger genannt, gebunden sein. Das ermöglicht es insbesondere bei ungeladenen zweiten Biomolekülen, eine Brücke durch elektrostatische Kräfte zu bilden. Selbstverständlich können auch geladene zweite Biomoleküle mit einem Ladungsträger versehen sein. Bei dem Ladungsträger kann es sich z.B. um einen Metallcluster, ein organisches Molekül oder einen Komplexbildner handeln.

10

Es ist vorteilhaft, wenn der Schritt lit. a zwischen dem Binden des ersten Endes des zweiten Biomoleküls an die erste Elektrode und dem Binden des zweiten Endes des zweiten Biomoleküls an die zweite Elektrode erfolgt. Beim Schritt lit. a kann die Bindung des ersten Biomoleküls an das zweite Biomolekül durch ein elektrisches Feld beschleunigt werden. Das elektrische Feld kann z.B. durch Anlegen eines Potentials an die Elektroden erzeugt werden. Vorteilhafterweise läßt sich durch das vorgeschlagene Verfahren die Strigenz auch durch Potentialänderungen variieren.

20

Die Wahl der jeweiligen Ausgestaltungsvarianten richtet sich nach der Art des ersten Biomoleküls. Dabei spielen die räumliche Ausdehnung des ersten Biomoleküls sowie dessen Ladung eine besondere Rolle.

25

Die erste und die zweite Elektrode sind zweckmäßigerweise auf einem elektrisch isolierenden Substrat aufgebracht. Nach einer weiteren Verfahrensvariante kann das Substrat vor dem Schritt lit. b gespült und/oder getrocknet und/oder evakuiert werden.

30

Nach einem weiteren Ausgestaltungsmerkmal wird die elektrische Leitfähigkeit des zwischen der ersten und der zweiten Elektrode gebundenen Komplexes gemessen. Anstatt der Leitfähigkeit kann auch die Kapazität und/oder die Impedanz des zwischen der ersten und der zweiten Elektrode gebundenen Komplexes gemessen werden. Die Messung der vorgenannten elektrischen Größen ermöglicht den Nachweis und/oder die Quantifizierung eines Biomoleküls, welches zumindest abschnittsweise eine Affinität zum zweiten Biomolekül aufweist.

10

Es hat sich als vorteilhaft erwiesen, daß der Abstand zwischen der ersten und der zweiten Elektrode 3 nm bis 1 µm, vorzugsweise 50nm, ist.

15 Das erste Biomolekül kann eine zum zweiten Biomolekül komplementäre einzelsträngige DNA oder RNA sein. Ferner kann das zweite Biomolekül auch abschnittsweise doppelsträngig ausgebildet sein, wobei der/die doppelsträngige/n Abschnitt/e vorzugsweise aus DNA und/oder RNA gebildet ist/sind.

20

In das zweite Biomolekül kann aber auch ein einzelsträngiger Abschnitt eingeschaltet sein; der einzelsträngige Abschnitt kann aus DNA, RNA oder PNA gebildet sein. Ferner kann in das zweite Biomolekül ein Protein oder ein Peptid eingeschaltet sein. Das ermöglicht beispielsweise den Nachweis von Antikörpern, sofern diese als erstes Biomolekül in der Lösung enthalten sind.

25

Die Sensitivität des Nachweises erster Biomoleküle läßt sich durch die jeweiligen Stringenzbedingungen einstellen. Die Stringenzbedingungen können beispielsweise durch eine Änderung der an den Elektroden angelegten Spannung geändert und an die jeweiligen Verhältnisse angepaßt werden.

30

- Um eine Mehrfachdurchführung des Verfahrens zu gewährleisten, kann zum Entfernen des ersten Biomoleküls vom zweiten Biomolekül nach dem Schritt lit. b eine Kraft auf das erste Biomolekül mittels einer angelegten Spannung ausgeübt werden. Ferner kann das Substrat nach dem Schritt lit. b gespült und/oder geheizt werden. Durch das Heizen kann eine thermische Denaturierung der ersten Biomoleküle erreicht werden. Bestimmte erste Biomoleküle binden vorzugsweise bei einer bestimmten vorgegebenen Temperatur. Durch Heizen bzw. Einstellen der Temperatur kann die Spezifität des Verfahrens weiter erhöht werden. Die Spezifität kann auch durch eine Variation des pH-Werts der Lösung erhöht oder durch eine bestimmte Salzkonzentration eingestellt werden.
- 15 Zur Verbesserung der Leitfähigkeit des aus dem ersten und dem zweiten Biomolekül gebildeten Komplexes können der Lösung Interkalatoren zugesetzt sein. Dabei handelt es sich um Moleküle, welche sich an bzw. in doppelsträngige Moleküle an- bzw. einlagern und Hoppingzentren bilden oder über andere Mechanismen eine erhöhte Leitfähigkeit zur Folge haben.

Nach weiterer Maßgabe der Erfindung ist eine Vorrichtung zum Nachweis und/oder zur Quantifizierung eines in einer Lösung enthaltenen ersten Biomoleküls vorgesehen, wobei

25

aa) eine erste und eine zweite Elektrode auf einem elektrisch isolierenden Substrat aufgebracht sind,

- bb) zumindest an der ersten Elektrode mit seinem einen Ende ein zweites Biomolekül gebunden ist, welches zum ersten Biomolekül zumindest abschnittsweise eine spezifische Affinität aufweist und wobei
- 30

cc) der Abstand zwischen der ersten und der zweiten Elektrode so gewählt ist, daß durch Binden des anderen Endes des zweiten Biomoleküls eine Brücke zwischen der ersten und der zweiten Elektrode herstellbar ist.

- 5 Die erfindungsgemäße Vorrichtung ermöglicht einen besonders sensitiven Nachweis sowie eine Quantifizierung von in der Lösung vorliegenden ersten Biomolekülen.

10 Die Elektroden können aus elektrisch leitfähigen Materialien wie z.B. Gold, einem leitfähigen Kunststoff oder Graphit bestehen. Des weiteren können die Elektroden auch in Form von Mikroelektroden, z.B. Nanotubes, ausgebildet sein.

15 Nach einer Ausgestaltung ist/sind die Elektrode/n mit im Bereich der gewählten Spannungen redoxinaktiven Molekülen beschichtet. Eine solche Beschichtung trägt zur Unterdrückung von verunreinigungsbedingten Leitfähigkeitsphänomenen bei.

20 Hinsichtlich weiterer vorteilhafter Ausgestaltungen der Vorrichtung wird auf die vorangegangene Beschreibung verwiesen.

Nach einer weiteren vorrichtungsseitigen Ausgestaltung sind eine Vielzahl erster und zweiter Elektroden auf dem Substrat angebracht. Vorteilhafterweise sind die an die ersten Elektroden gebundenen zweiten Biomoleküle voneinander verschieden, so daß ein gleichzeitiger Nachweis und/oder eine Quantifizierung einer Vielzahl erster Biomoleküle möglich ist. Der erfindungsgemäße Chip hat den Vorteil, daß damit auf einfache Weise ein Nachweis und/oder eine Quantifizierung in einer Lösung 30 enthaltener erster Biomoleküle möglich ist. Die Quantifizierung kann digital erfolgen. Dabei kann man sich vorteilhafterweise den Umstand zu Nutze machen, daß jede Brücke ein besonderes Signal liefert. Es kann insbesondere auf die einen

hohen apparativen Aufwand erfordernden optischen Detektionseinrichtungen verzichtet werden.

Nachfolgend werden anhand der Zeichnung Ausführungsbeispiele
5 der Erfindung näher erläutert. Hierin zeigen:

- Fig. 1 ein erstes Ausführungsbeispiel einer erfindungsgemäßen Vorrichtung,
- 10 Fig. 2 ein zweites Ausführungsbeispiel einer erfindungsgemäßen Vorrichtung,
- Fig. 3 ein drittes Ausführungsbeispiel einer erfindungsgemäßen Vorrichtung,
- 15 Fig. 4 schematisch eine erste Verfahrensvariante,
- Fig. 5 schematisch eine zweite Verfahrensvariante,
- 20 Fig. 6 schematisch eine dritte Verfahrensvariante,
- Fig. 7a - c schematisch die Teilschritte einer vierten Verfahrensvariante und
- 25 Fig. 8a - d schematisch die Teilschritte und das Meßergebnis einer fünften Verfahrensvariante.

In den Fig. 1 bis 3 ist mit 1 ein z.B. aus Silizium, Silizium mit Oxidschicht, Quarzkristall, Glas oder Glimmer hergestelltes im wesentlichen elektrisch isolierendes Substrat bezeichnet.
30 Auf dem Substrat 1 aufgebracht sind eine erste 2a und eine zweite Elektrode 2b. In den Fig. 1 und 2 sind die elektrischen Verbindungen der Elektroden 2a, 2b mit einer (hier

nicht dargestellten) Meßeinrichtung aus Gründen der Klarheit nicht gesondert dargestellt. Eine einzelsträngige DNA 3 ist mit ihrem einen Ende E1 an die erste Elektrode 2a und mit ihrem anderen Ende E2 an die zweite Elektrode 2b gebunden. Sie bildet also eine brückenartige Verbindung zwischen den beiden Elektroden 2a und 2b.

Es ist auch möglich, daß z.B. nur das eine Ende E1 an die ersten Elektrode 2a gebunden ist, während das zweite Ende E2 zunächst frei beweglich ist. An das zweite Ende E2 ist in diesem Fall zweckmäßigerweise ein Dentrimer gebunden. Das zweite Ende E2 kann durch Anlegen eines geeigneten Potentials an die zweite Elektrode 2b angezogen und mittels des Goldclusters gebunden werden.

In Fig. 3 ist ein erfindungsgemäßer Chip gezeigt. Dabei liegt eine Vielzahl diskreter erster Elektroden 2a einer gemeinsamen zweiten Elektrode bei 2b gegenüber. Jede der ersten Elektroden 2a ist mit einer separaten Zuleitung 4 versehen. Der Chip ist nach herkömmlicher lithographischer Technik hergestellt. Die die erste 2a und die zweite Elektrode 2b verbindenden Biomoleküle sind hier aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt.

In der Fig. 4 ist schematisch eine erste Variante zum Nachweis eines einzelsträngigen ersten DNA-Moleküls 5 gezeigt. An die erste Elektrode 2a ist über ein mit S bezeichnetes Spacer-Molekül das zweite einzelsträngige DNA-Molekül 3 gebunden. Am anderen Ende E2 des zweiten DNA-Moleküls 3 ist ein Goldcluster 6 vorgesehen. Durch Anlegen eines Potentials ist hier zunächst eine brückenartige Verbindung mittels des zweiten DNA-Moleküls 3 zwischen der ersten 2a und der zweiten Elektrode 2b hergestellt worden. Der Goldcluster 6 beschleunigt

nigt die Bindung des anderen Endes E2 mit der zweiten Elektrode 2b. Das in der Lösung befindliche erste DNA-Molekül 5 ist zum zweiten DNA-Molekül 3 komplementär. Sobald die gezeigte Vorrichtung mit der Lösung in Kontakt gebracht wird, kommt es zu einer Hybridisierung des zweiten DNA-Moleküls 3 mit dem dazu komplementärem ersten DNA-Molekül 5. Das gebildete doppelsträngige DNA-Molekül weist eine signifikant höhere elektrische Leitfähigkeit auf, als die erste 2a und die zweite Elektrode 2b verbindende einzelsträngige zweite DNA-Molekül. Diese besondere erhöhte elektrische Leitfähigkeit tritt insbesondere nur dann auf, wenn eine weitgehend vollständige Hybridisierung vorliegt. Mittels des beschriebenen Verfahrens kann mit einer hohen Sensitivität das Vorliegen erster DNA-Moleküle 5 in der Lösung detektiert werden.

Die in Fig. 5 gezeigte zweite Verfahrensvariante eignet sich insbesondere zum Nachweis von Antikörpern 8. Die Verbindung zwischen der ersten 2a und der zweiten Elektrode 2b ist hier durch ein abschnittsweise doppelsträngiges Biomolekül 7 ausgebildet, dessen Enden E1 und E2 jeweils mittels eines Spacer-Moleküls S an die erste 2a bzw. die zweite Elektrode 2b gebunden sind. In das erste Biomolekül 7 ist eine einzelsträngige Peptidsequenz 7a eingeschaltet. Bei Vorliegen eines dazu korrespondierenden Antikörpers in der Lösung bindet dieser an die einzelsträngige Peptidsequenz 7a. Die Leitfähigkeit des gebildeten Konstrukts ist erhöht. Damit gelingt auf einfache Weise ein Nachweis von in der Lösung befindlichen Antikörpern 8.

Bei der in Fig. 6 gezeigten dritten Verfahrensvariante ist in einem Strang des Biomoleküls 7 eine Haarnadelschleife 9 ausgebildet. Im Bereich der Haarnadelschleife 9 ist der gegenüberliegende Strang unterbrochen. Bei der Bindung des Anti-

körpers 8 an den dazu korrespondierenden einzelsträngigen Peptidabschnitt 7a kommt es zu einer Konformationsänderung. Das gebildete Konstrukt zieht sich zusammen. Die Haarnadelschleife 9 wird gestreckt. Die die Unterbrechung begrenzenden
5 Enden des gegenüberliegenden Strangs entfernen sich voneinander. Eine zuvor beobachtbare Leitfähigkeit nimmt bei der Bindung des Antikörpers 8 an den einzelsträngigen Peptidabschnitt 7a ab. Damit ist ein einfacher Nachweis von in der Lösung befindlichen Antikörpern 8 möglich.

10

In Fig. 7a bis 7c ist eine vierte Verfahrensvariante gezeigt. Eine zu einem ersten Biomolekül, z.B. einem ersten DNA-Molekül 5, komplementäres zweites Biomolekül, z.B. ein zweites DNA-Molekül 3, ist über einen Linkers L an die erste
15 Elektrode 2a gebunden. Am anderen Ende des zweiten DNA-Moleküls 3 ist ein geladenes Molekül 10 gebunden. Beim Inkontakbringen mit einer das erste DNA-Molekül 5 enthaltenden Lösung hybridisiert das erste DNA-Molekül 5 mit dem zweiten DNA-Molekül 3. Danach wird gespült. Anschließend wird eine
20 Spannung zwischen der ersten 2a und der zweiten Elektrode 2b angelegt. Auf das geladene Molekül 10 wird eine Kraft ausgeübt. Das geladene Molekül 10 wird an die zweite Elektrode 2b angezogen (siehe Fig. 7c). Es bildet sich eine Brücke. Über die gebildete Brücke kann die Leitfähigkeit des doppelsträngigen Komplexes unmittelbar mittels einer einfachen Strom-
25 Spannungsmessungen ermittelt werden. Die Messung kann auch bei Abwesenheit der Lösung, d.h. im trockenen Zustand erfolgen.

30 Die Fig. 8a bis 8c zeigen eine fünfte Verfahrensvariante; Fig. 8d zeigt schematisch ein dabei beobachtetes Meßergebnis. In den Fig. 8a bis 8c ist ein Abschnitt eines Arrays gezeigt, welches mehrere erste 2a und zweite Elektroden 2b enthält. An

die ersten Elektroden 2a sind unterschiedliche zweite Biomoleküle, z.B. zweite DNA-Moleküle 3, 3' und 3'', mittels eines Linkers gebunden. Beim Inkontaktbringen eines solchen Elektroden-Arrays mit einer unterschiedliche erste Biomoleküle, z.B. erste DNA-Moleküle 5, 5^x und 5'' enthaltenden Lösung kommt es je nach der Affinität der ersten DNA-Moleküle 5, 5^x und 5'' zu den zweiten DNA-Molekülen 3, 3' und 3'' zu einer Hybridisierung. Im vorliegenden Beispiel hybridisiert das erste DNA-Molekül 5 mit dem zweiten DNA-Molekül 3 und das erste DNA-Molekül 5'' mit dem zweiten DNA-Molekül 3''. Das zweite DNA-Molekül 3' ist nicht komplementär zum der Lösung enthaltenen ersten DNA-Molekül 5^x. Nach dem Spülen des Elektroden-Arrays wird zwischen der ersten 2a und der zweiten Elektrode 2b eine Spannung angelegt, so daß durch die Biomoleküle eine Brücke zwischen den beiden Elektroden 2a, 2b gebildet wird. Es wird nun die Leitfähigkeit zwischen jedem Elektrodenpaar 2a, 2b gemessen. Das dabei erzielte Meßergebnis ist schematisch in Fig. 8d wiedergegeben. Die höchste Leitfähigkeit zeigt das Elektrodenpaar, welches zwei Brücken mit hybridisierten DNA-Molekülen 3, 5 aufweist. Die Leitfähigkeit bei der Bildung lediglich einer Brücke ist etwa halb so groß. Sie ist bei dem aus dem DNA-Molekülen 3'' und 5'' beobachtbar. Die allein durch das zweite DNA-Molekül 3' gebildete Brücke führt dagegen kaum zu einer unmittelbaren Leitfähigkeit zwischen den Elektroden 2a, 2b.

Mit dem vorgeschlagenen Verfahren können hoch sensitiv in einer Lösung enthaltene erste Biomoleküle detektiert werden. Die Sensitivität kann insbesondere auch durch die Belegungs- dichte der ersten Elektrode 2a erhöht werden.

Bezugszeichenliste

	1	Substrat
	2a, 2b	erste, zweite Elektrode
5	3, 3', 3''	zweite DNA-Moleküle
	4	Zuleitung
	5, 5', 5''	erste DNA-Moleküle
	6	Goldcluster
	7	Biomolekül
10	7a	einzelsträngiger Peptidabschnitt
	8	Antikörper
	9	Haarnadelschleife
	10	geladenes Molekül
15	E1	Ende
	E2	zweites Ende
	S	Spacer
	L	Linker

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis und/oder zur Quantifizierung eines in einer Lösung enthaltenen ersten Biomoleküls (5, 8),
5 mit folgenden Schritten:
 - a) Binden des ersten Biomoleküls (5, 8) an ein zweites Biomolekül (3, 7), welches zum ersten Biomolekül (5, 8) zumindest abschnittsweise eine spezifische Affinität aufweist und
10
 - b) Messen der elektrischen Leitfähigkeit des aus dem ersten (3, 7) und dem zweiten Biomolekül (5, 8) gebildeten Komplexes, wobei das zweite Biomolekül (3, 7) eine Brücke zwischen einer ersten (2a) und einer zweiten Elektrode (2b) bildet.
15
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das zweite Biomolekül (5, 8) vor dem Schritt lit. a zumindest mit einem Ende (E1) an eine der Elektroden (2a, 2b) gebunden wird.
- 20 3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Bindung mindestens eines Endes (E1) des zweiten Biomoleküls (5, 8) an die eine Elektrode (2a, 2b) über einen Spacer-(S) und/oder ein Linker-Molekül vermittelt wird.
- 25 4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das zweite Biomolekül (5, 8) vor oder nach dem Schritt lit. a mit dem anderen Ende (E2) an die zweite Elektrode (2b) gebunden wird.
- 30 5. Verfahren nach Anspruch 3, wobei das Binden des anderen Endes (E2) durch Anlegen eines Potentials unterstützt wird.

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei an das andere Ende (E2) des zweiten Biomoleküls (3, 7) ein Ladungsträger (6) gebunden ist.

5 7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei der Ladungsträger (6) ein Metallcluster, ein organisches Molekül oder ein Komplexbildner ist, der die Bindung des anderen Endes (E2) an die zweite Elektrode (2b) über den Ladungsträger (6) vermittelt wird.

10

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Schritt lit. a zwischen den Binden des einen Endes (E1) des zweiten Biomoleküls (3, 7) an die erste Elektrode (2a) und dem Binden des anderen Endes (E2) des zweiten Biomoleküls
15 (3, 7) an die zweite Elektrode (2b) erfolgt.

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die erste (2a) und die zweite Elektrode (2b) auf einem elektrisch isolierenden Substrat (1) aufgebracht sind.

20

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Substrat (1) vor dem Schritt lit. b gespült und/oder getrocknet und/oder evakuiert wird.

25 11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die elektrische Leitfähigkeit des zwischen der ersten (2a) und der zweiten Elektrode (2b) gebundenen Komplexes gemessen wird.

30 12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei anstatt der Leitfähigkeit die Kapazität des zwischen der ersten (2a) und der zweiten Elektrode (2b) gebundenen Komplexes gemessen wird.

13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei anstatt der Leitfähigkeit die Impedanz des zwischen der ersten (2a) und der zweiten Elektrode (2b) gebundenen Konstrukts gemessen wird.

5

14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Abstand zwischen der ersten (2a) und der zweiten Elektrode (2b) 3 nm bis 1 μ m, vorzugsweise 50 nm, ist.

10 15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das erste Biomolekül (3, 7) eine zum zweiten Biomolekül (5, 8) komplementäre einzelsträngige DNA oder RNA ist.

15 16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das zweite Biomolekül (5, 8) abschnittsweise doppelsträngig ausgebildet ist, wobei der/die doppelsträngige/n Abschnitt/e vorzugsweise aus DNA und/oder RNA gebildet ist/sind.

20 17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei in das zweite Biomolekül (5, 8) ein einzelsträngiger Abschnitt eingeschaltet ist.

25 18. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der einzelsträngige Abschnitt aus DNA, RNA oder PNA gebildet ist.

19. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei in das zweite Biomolekül (5, 8) mit einem Protein oder einem Peptid assoziiert ist.

30

20. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zum Entfernen des ersten Biomoleküls (5, 8) vom zweiten Biomolekül (3, 7) nach dem Schritt lit. b eine Kraft auf das er-

ste Biomolekül (5, 8) mittels einer angelegten Spannung ausgeübt wird.

21. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
5 zum Entfernen des ersten Biomoleküls (5, 8) vom zweiten Biomolekül (3, 7) das Substrat (1) nach dem Schritt lit. b gespült wird.

22. Vorrichtung zum Nachweis und/oder zur Quantifizierung
10 eines in einer Lösung enthaltenen ersten Biomoleküls (5, 8), wobei

aa) eine erste (2a) und eine zweite Elektrode (2b) auf einem elektrisch isolierenden Substrat (1) aufgebracht sind,
15

bb) zumindest an der ersten Elektrode (2a) mit seinem einen Ende (E1) ein zweites Biomolekül (3, 7) gebunden ist, welches zum ersten Biomolekül (5, 8) zumindest abschnittsweise eine spezifische Affinität aufweist, und wobei
20

cc) der Abstand zwischen der ersten (2a) und der zweiten Elektrode (2b) so gewählt ist, daß durch Binden des anderen Endes (E2) des zweiten Biomoleküls (3, 7) eine Brücke zwischen der ersten (2a) und der zweiten Elektrode (2b) herstellbar ist.
25

23. Vorrichtung nach Anspruch 22, wobei der Abstand zwischen der ersten (2a) und der zweiten Elektrode (2b) 3 nm bis 1 µm, vorzugsweise 50 nm, ist.
30

24. Vorrichtung nach Anspruch 22 oder 23, wobei zumindest das eine Ende (E1) des zweiten Biomoleküls (5, 8) an die eine

Elektrode (2a, 2b) über eine direkte Kopplung, einen Spacer-(S) und/oder ein Linker-Molekül (L) gebunden ist.

25. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 22 bis 24, wobei an
5 das andere Ende (E2) des zweiten Biomoleküls (3, 7) ein Ladungsträger (6) gebunden ist.

26. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 22 bis 25, wobei
10 der Ladungsträger (6) ein Metallcluster, ein organisches Molekül oder ein Komplexbildner ist und die Bindung des anderen Endes (E2) an die zweite Elektrode (2b) über den Ladungsträger (6) vermittelbar ist.

27. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 22 bis 26, wobei
15 das Substrat (1) aus Keramik, aus Siliziumverbindungen, vorzugsweise Silizium mit Oxidschicht, aus Glimmer oder aus einer elektrisch isolierenden Polymermatrix hergestellt ist.

28. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 22 bis 27, wobei
20 eine mit der ersten (2a) und der zweiten Elektrode (2b) verbundene Einrichtung zum Messen der elektrischen Leitfähigkeit des aus dem ersten (3, 7) und dem zweiten Biomolekül (5, 8) gebildeten Konstrukts vorgesehen ist.

25 29. Vorrichtung nach Anspruch 28, wobei mittels der Einrichtung anstatt der Leitfähigkeit die Kapazität des aus dem ersten (5, 8) und dem zweiten Biomolekül (3, 7) gebildeten Konstrukts meßbar ist.

30 30. Vorrichtung nach Anspruch 28, wobei mittels der Einrichtung anstatt der Leitfähigkeit die Impedanz des aus dem ersten (5, 8) und dem zweiten Biomolekül (3, 7) gebildeten Konstrukts meßbar ist.

31. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 22 bis 30, wobei das erste Biomolekül (5, 8) eine zum zweiten Biomolekül (3, 7) komplementäre einzelsträngige DNA oder RNA ist.
- 5 32. Vorrichtung nach Anspruch 31, wobei das zweite Biomolekül (3, 7) abschnittsweise doppelsträngig ausgebildet ist, wobei die doppelsträngigen Abschnitte vorzugsweise aus DNA und/oder RNA gebildet ist/sind.
- 10 33. Vorrichtung nach Anspruch 32, wobei in das zweite Biomolekül (3, 7) ein einzelsträngiger Abschnitt eingeschaltet ist.
34. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 22 bis 33, wobei
15 der einzelsträngige Abschnitt aus DNA, RNA oder PNA gebildet ist.
35. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 22 bis 34, wobei in das zweite Biomolekül (3, 7) ein Protein oder ein Peptid eingeschaltet ist.
20
36. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 22 bis 35, wobei eine Vielzahl erster (2a) und zweiter Elektroden (2b) auf dem Substrat (1) angebracht sind.
25
37. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 22 bis 36, wobei die an die ersten Elektroden (2a) gebundenen zweiten Biomoleküle (3, 7) voneinander verschieden sind, so daß ein gleichzeitiger Nachweis und/oder Quantifizierung einer Vielzahl erster Biomoleküle (5, 8) möglich ist.
30

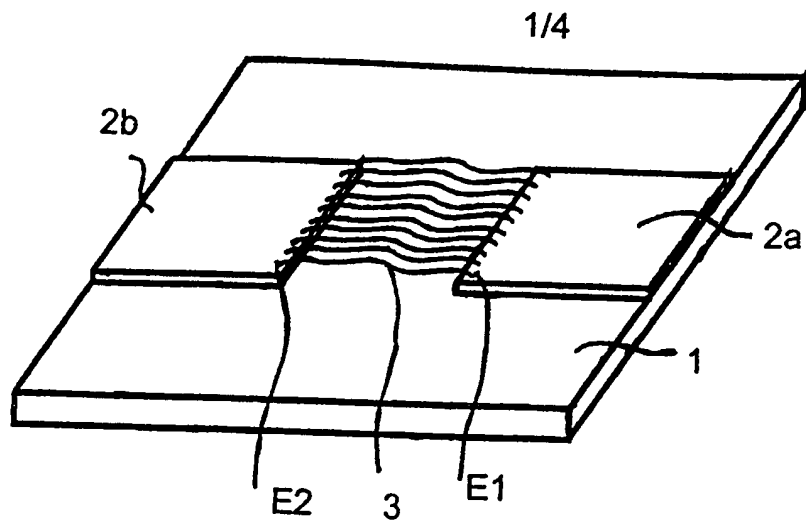


Fig. 1

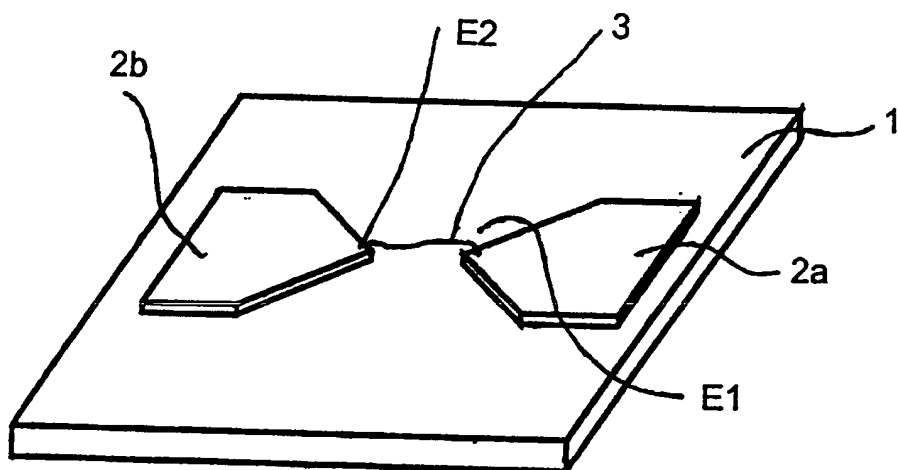


Fig. 2

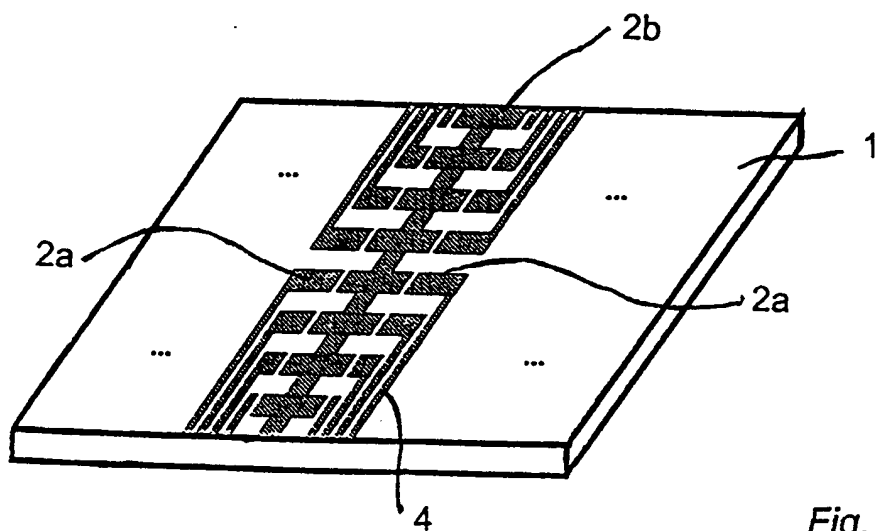


Fig. 3

2/4

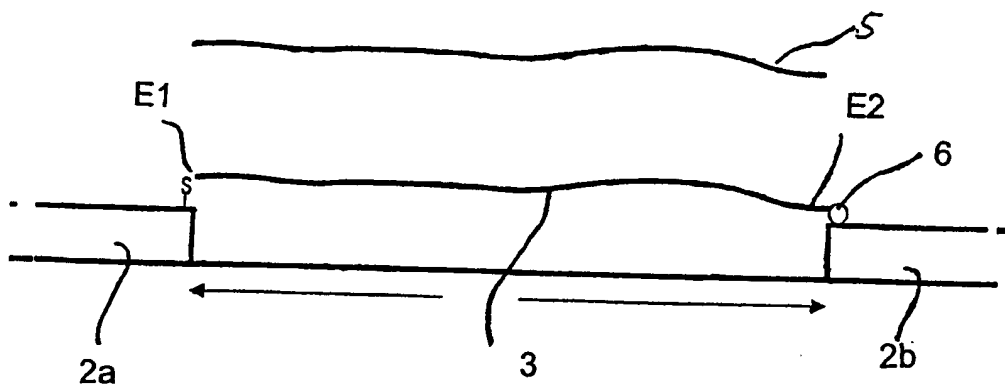


Fig. 4

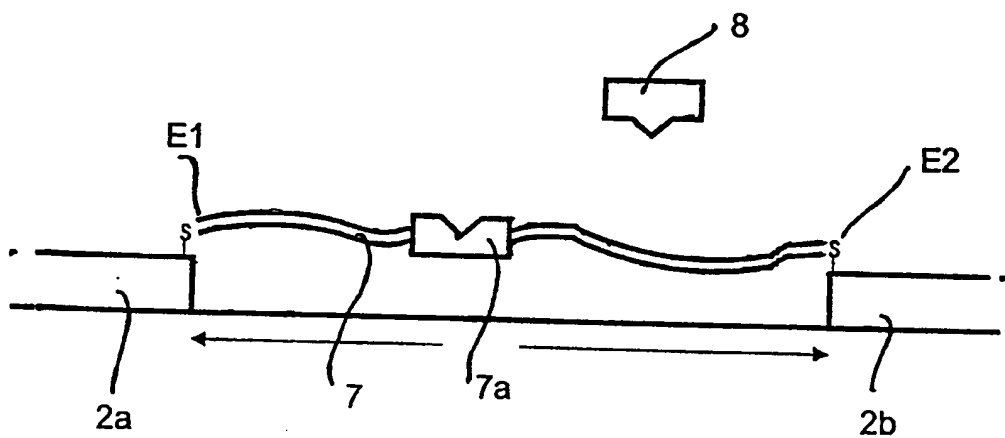


Fig. 5

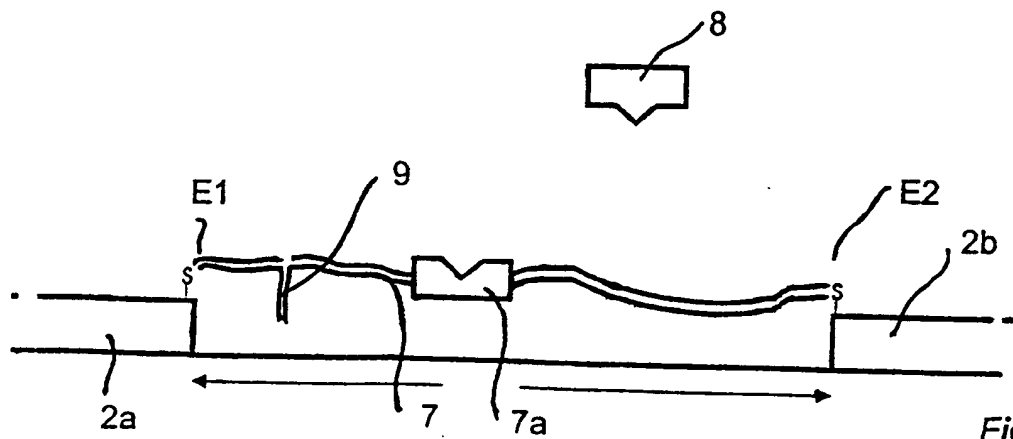


Fig. 6

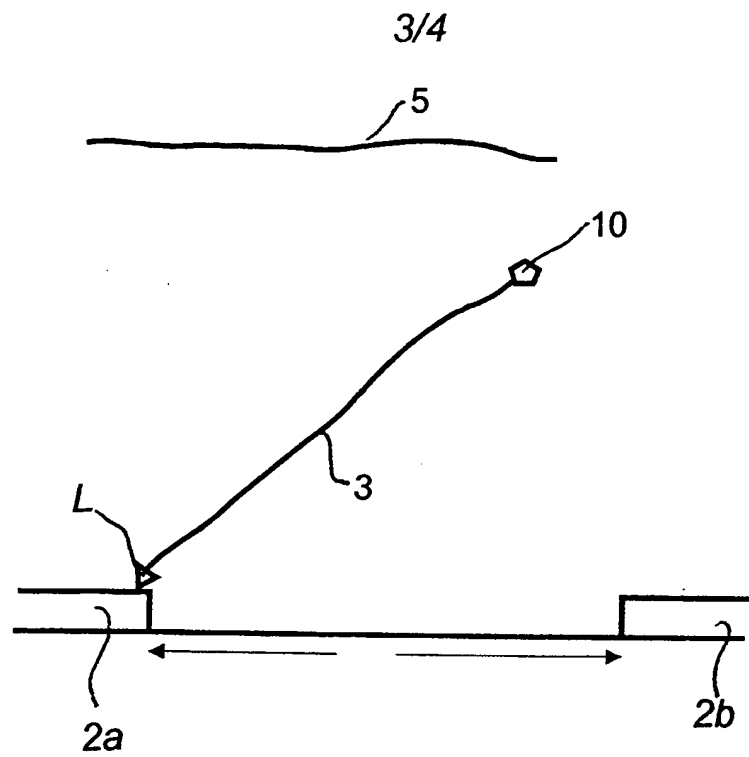


Fig. 7a

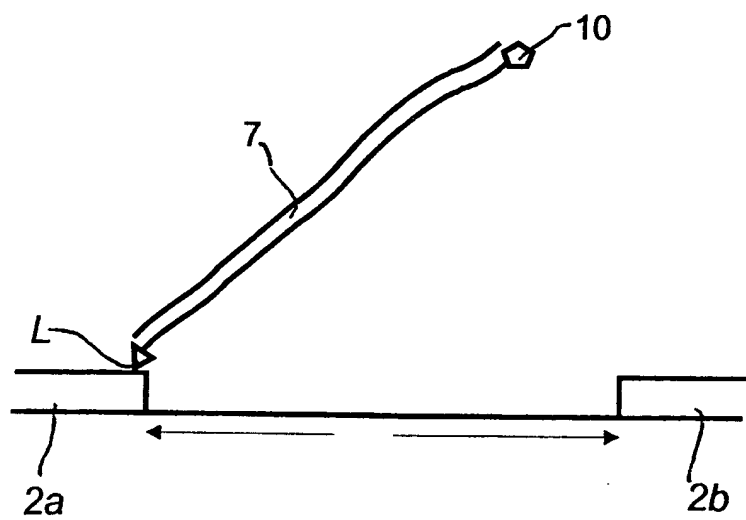


Fig. 7b

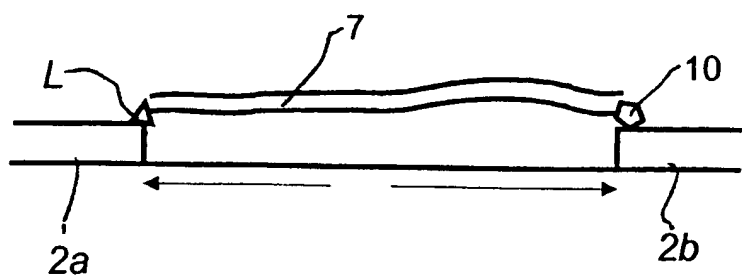


Fig. 7c

4/4

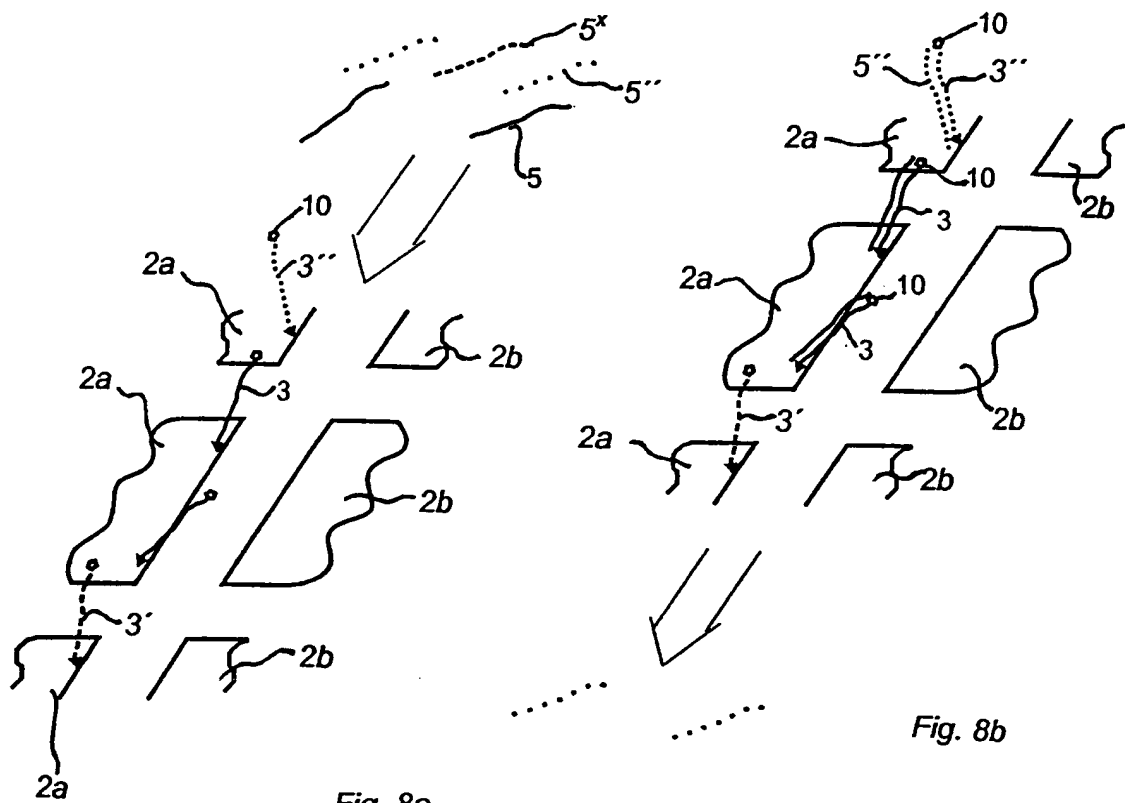


Fig. 8a

Fig. 8b

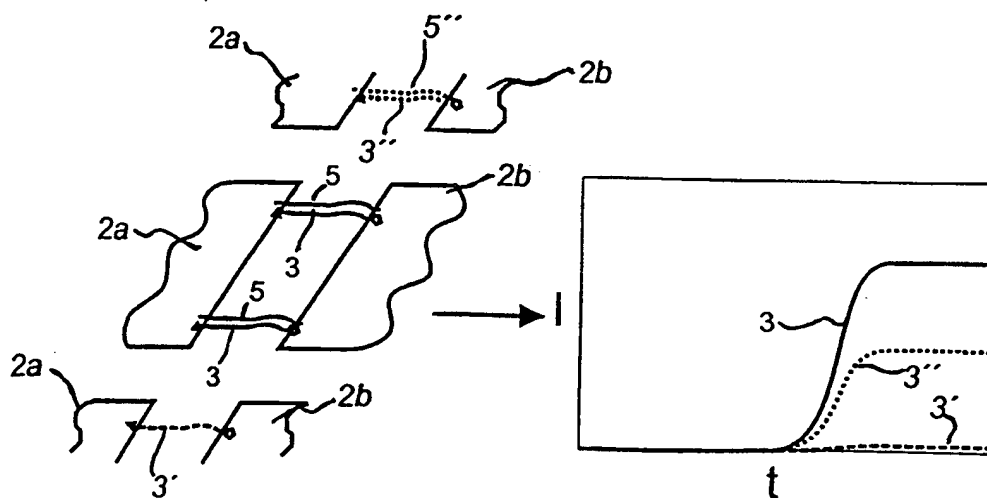


Fig. 8c

Fig. 8d